

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.  
10. Jg. 1972, S. 226—229

## Eine verbesserte Bestimmung der Amylase mittels Amylopektin Azur

Von H. J. WEIS, H. CÖLLE und H. J. NORD

*Aus der 1. Medizinischen Klinik und Poliklinik (Direktor: Professor Dr. H. P. Wolff)  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz*

(Eingegangen am 14. Juni 1971/12. Januar 1972)

Die Amylasebestimmung mit Amylopektin Azur beruht auf dem neuen Prinzip, daß das Enzym lösliche Oligosaccharide freisetzt, die mit dem Farbstoff Remazolbrillant Blau markiert sind. Durch Verwendung von Tris-Puffer als Lösungsmittel und Aceton-Essigsäure als Stoppmittel der Enzymaktivität konnte die Empfindlichkeit der Methode und ihre Durchführbarkeit wesentlich gesteigert werden. Eiweiß, Bilirubin und pH-Werte der Amylaselösungen beeinflussen das Endergebnis nicht. Bei Proben, die makroskopisch sichtbar freies Hämoglobin enthalten, muß die erhöhte Leerwertextinktion berücksichtigt werden. Die Methode ist in 30 Min. durchführbar und zeigt eine gute Reproduzierbarkeit (Variationskoeffizient 2,35%). Der einzige Nachteil besteht in der notwendigen Standardisierung jeder neuen Charge von Amylopektin Azur.

### *An improved determination of amylase with the aid of Amylopectin Azure*

A method for the determination of amylase based on a new principle is reported. Amylopectin Azure is used as the substrate and soluble oligosaccharides, labeled with the dye remazole brilliant blue, are released by the activity of the enzyme. The sensitivity and speed of operation are markedly increased by using tris buffer for the incubation and by stopping the reaction with acetone-acetic acid. The presence of albumin or bilirubin and variations of pH in the amylase solution do not influence the results. However, in samples visibly containing free haemoglobin, the blank extinction is markedly raised. Each determination requires 30 min. and shows good reproducibility (var. coeff. 2.35%). The only disadvantage is the necessity to standardize every new batch of Amylopectin Azure.

Das älteste Prinzip der Amylasebestimmung beruht auf dem Nachweis der verbliebenen Substratmenge am Ende der Inkubationszeit mit Hilfe der Jod-Stärke-Reaktion (sog. amyloklastische Methode). Eine zweite Kategorie umfaßt jene Methoden, die die entstandenen reduzierenden Gruppen der Oligosaccharide messen (sog. saccharogene Bestimmung). Die zahlreichen Variationen dieser beiden Prinzipien weisen darauf hin, daß keine ideal ist (1).

Bei dem neuen Substrat Amylopektin Azur handelt es sich um den Stärkebaustein Amylopektin, an dessen Glukosemoleküle der Farbstoff Remazolbrillant Blau gebunden ist. Das neue Prinzip der Amylasebestimmung beruht auf der Messung der Extinktion dieses Farbstoffes und ist, wie unsere Studien gezeigt haben, weitgehend unabhängig vom pH-Wert der Lösung, Temperatur und Eiweißkonzentration. Hohe Empfindlichkeit, rasche Durchführbarkeit und gute Reproduzierbarkeit lassen den Test für das klinische Labor geeignet erscheinen.

### Methodik

#### Prinzip

Unter der Einwirkung der Amylase werden aus Amylopektin Azur lösliche, niedermolekulare Zucker mit Remazolbrillant Blau freigesetzt, dessen photometrische Messung eine Bestimmung der Amylaseaktivität ermöglicht.

#### Reagenzien

*Amylopektin Azur* wurde von der Firma Calbiochem bezogen, die übrigen Reagenzien von Merck. Amylopektin Azur bildet in

wäßr. Lösung eine Suspension, die durch Erwärmen bis 70° nicht verändert wird.

*Tris-Puffer:* 6,06 g Trishydroxymethylaminomethan werden zusammen mit 5,6 g NaCl in 200 ml dest. Wasser gelöst. Der pH-Wert wird mit 1N HCl auf 7,5 eingestellt, die Lösung mit dest. Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Bei Lagerung im Kühlschrank ist diese Lösung drei Monate lang haltbar.

*Aceton-Essigsäure* (1:1)

#### Ansatz

Für den Leerwert und jede Probe werden 40 mg Amylopektin Azur und 2 ml Tris-Puffer benötigt. Die berechneten Gesamtmengen werden in einem Becherglas kurz mit einem Magneten kräftig gerührt, so daß sich eine homogene Suspension bildet. Daraus werden 2 ml pro Probe in ein Reagenzglas mit Rundkuppe pipettiert. Nach 5 Min. Inkubation im Wasserbad bei 37° C wird 0,1 ml der amylosehaltigen Lösung zugegeben, und das Reagenzglas kurz geschüttelt. Nach genau 10 Min. Inkubation wird 1 ml Aceton-Essigsäure zugegeben und bei 600—2000 g zentrifugiert. Die Extinktion des Überstandes wird bei einer Wellenlänge von 595 nm innerhalb 4 Stdn. gemessen.

### Ergebnisse

Remazolbrillant Blau, das im Überstand an die löslichen Oligosaccharide gebunden ist, zeigt eine typische Absorptionskurve mit einem Maximum bei 595 nm (Abb. 1).

Da in früheren Untersuchungen (8, 9) Phosphat-Puffer als Lösungsmittel des Amylopektins verwendet wurde, haben wir 10 Amylaselösungen gleichzeitig in Phosphat-Puffer und Tris-Puffer mit Amylopektin getestet. Die Ergebnisse in Tris-Puffer lagen durchschnittlich um 40% höher.

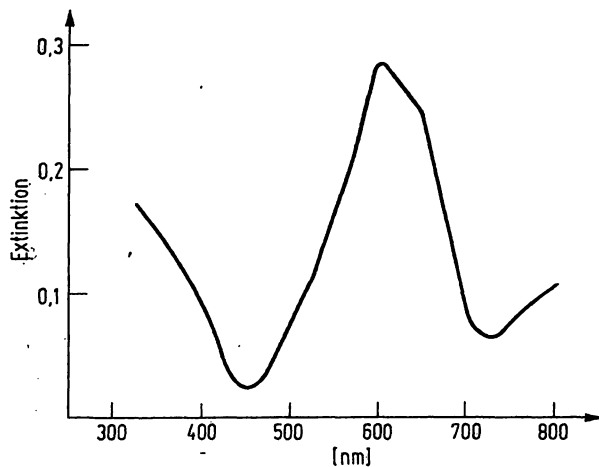


Abb. 1

Das Absorptionsspektrum von Amylopektin Azur zeigt einen schmalen Gipfel mit einem Maximum bei 595 nm

In den wenigen Untersuchungen, die sich bisher mit Remazolbrillant-Blau-Stärke beschäftigt haben (8, 9), wurde die Amylaseaktivität durch wäßr. Essigsäurelösung gestoppt. Nach Zentrifugieren solcher Proben besteht jedoch ein störender Oberflächenfilm, zu dessen Entfernen Filtrieren empfohlen wurde. Danach sinken jedoch je nach Porengröße der Filter die Extinktionswerte (bei Selecta-Filter Nr. 597 Verminderung um 30%, bei Nr. 602 um 70%). Um das Filtrieren zu umgehen, haben wir statt der Essigsäure-Wasser-Lösung eine Aceton-Essigsäure-Lösung verwendet, womit der störende Oberflächenfilm nicht mehr zu beobachten war. Testproben der gleichen Amylaselösung, die einmal mit wäßr. Essigsäure-Lösung und zum andern mit Aceton-Essigsäure-Lösung gestoppt wurden, ergaben nach Zentrifugieren den gleichen Extinktionswert. Proben, die mit Aceton-Essigsäure gestoppt waren, wurden in ihrer Extinktion weder durch verschieden starkes Zentrifugieren (getestet wurde zwischen 600 und 2200 g) noch die Zeitdauer des Zentrifugierens (getestet zwischen 5 und 15 Min.) beeinflusst. Blieben die offenen Proben bei Raumtemperatur stehen, so stiegen die Extinktionen nach 4 Stdn. um durchschnittlich 2,9% und nach 24 Stdn. um 5% an. Diese geringfügigen Veränderungen beruhen auf einer Verdunstung des Acetons. Nach Abstoppen der Proben mit den früher angegebenen wäßr. Essigsäure-Lösungen (8, 9) wird der pH-Wert auf 4 gesenkt, nach Zugabe von Aceton-Essigsäure jedoch auf 2,3 unter sofortiger Sistierung der Amylaseaktivität.

#### Einfluß von Eiweißgehalt, Bilirubin und Hämoglobin

Da in Serum und Urin stark unterschiedlich *Eiweißkonzentrationen* vorliegen, wurde ihr Einfluß auf die Extinktion des Farbstoffes untersucht. Zusatz von 0,1 ml physiologischer NaCl-Lösung und gleicher Volumina 10, 50 und 100 g/l Humanalbumin-NaCl-Lösungen änderten die Extinktionen von Remazolbrillant Blau nicht.

Zur Überprüfung des Einflusses von *Bilirubin* wurden 4 mg in 0,5 ml 1,2 proz.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung gelöst, und 0,1 ml davon wurde zu 4 ml Serum gegeben. Die Bilirubinkonzentration des Serum, die vorher unter 10 mg/l lag, erreichte damit 200 mg/l. Die Bestimmung der Amylaseaktivität in dem Nativserum mit  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Zugabe und im gleichen Serum mit Bilirubinzugabe ergab keine Beeinflussung der Extinktionen von Remazolbrillant Blau.

Die Extinktion kann jedoch durch freies *Hämoglobin* erhöht werden. In einer von 2 Blutproben des gleichen Patienten wurde mechanisch eine Hämolyse erzeugt. Das freie Hämoglobin betrug 10,4 g/l Serum und täuschte eine Steigerung der Amylaseaktivität um 16,6% vor, wenn die Extinktion gegen den Leerwert des makroskopisch hämolysefreien Serums gemessen wurde. In einem zweiten Fall erreichte das freie Hämoglobin 19,4 g/l Serum und die Extinktion war fälschlich um 116% erhöht. Wurde jedoch die Erhöhung der Leerwertextinktion durch freies Hämoglobin berücksichtigt, so wurden gleiche Amylaseaktivitäten wie bei hämolysefreiem Serum errechnet.

#### Bestimmungsbereich und Reproduzierbarkeit

Zur Ermittlung des Meßbereiches wurde lyophilisierte Schweine-Pankreas-Amylase in physiologischer NaCl-Lösung aufgelöst und eine Verdünnungsreihe getestet. Wie aus Abbildung 2 hervorgeht, verläuft die Kurve bis 4 mg Amylase/l linear. Um sicher zu sein, daß auch bei dieser Amylasekonzentration die Extinktionszunahme pro Zeiteinheit noch konstant bleibt, wurde die Farbstofffreisetzung bis 15 Min. Inkubation gemessen. Wie die Abbildung 3 zeigt, nimmt die Extinktion pro Zeiteinheit bis 15 Min. linear zu. RINDERKNECHT und Mitarbeiter (8) hatten ursprünglich empfohlen, die Proben in einen Schüttelinkubator zu stellen. Gleich HALL und Mitarbeitern (9) haben wir die

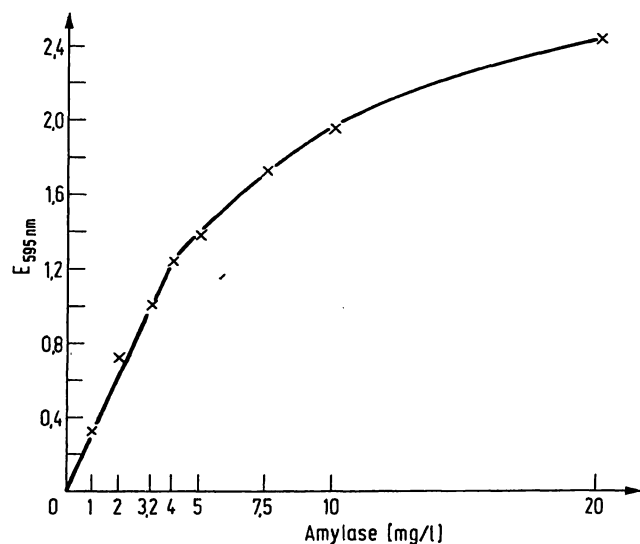


Abb. 2

Die Inkubation mit steigenden Mengen lyophilisierter Schweine-Pankreas-Amylase zeigt bis 4 mg/l Amylase (= 600 U/l) eine lineare Farbstofffreisetzung aus Amylopektin Azur. Höhere Enzymaktivitäten müssen daher unter 600 U/l verdünnt werden

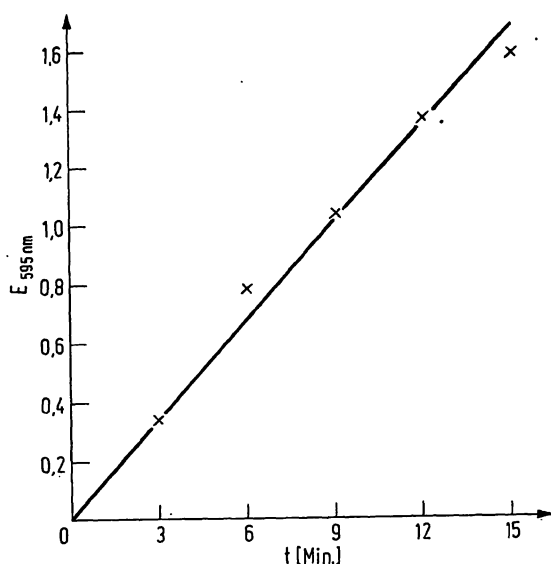
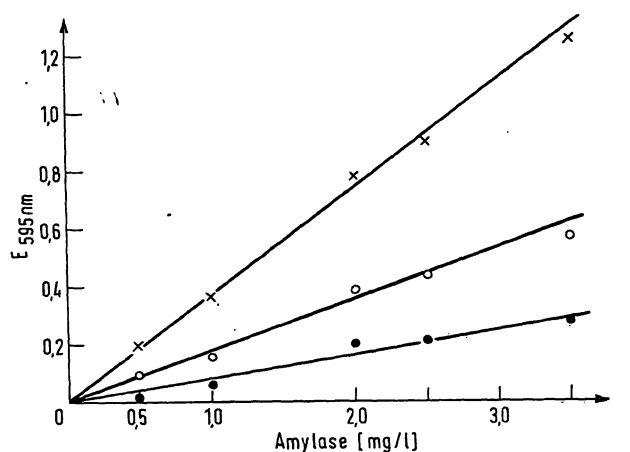


Abb. 3  
Lineare Extinktionszunahme über eine Inkubationszeit von 15 Min.  
bei 4 mg/l Amylase



	x Amylopek- tin Azur	o STREET-CLOSE Ext.	U/l	• FRIED- HOEFLMAYR
Korrelationskoeffi- zient	0,9976	0,9945	0,9945	0,9813
Steigung	2,6865	5,4844	0,0057	0,0091
y = 0; x =	-0,0100	0,0428	0,0574	0,2137
Streuung	0,0632	0,0964	0,1417	0,2531

Gleichungen  $z = 0,372x$   $y = 175x$

Umwandlungsfaktor:  $F \cdot z = y$   $F = 470$

Berechnung für  
Amylopektin Azur:  $(\text{Ext. Probe} - \text{Ext. Leerwert}) \cdot 470 = \text{U/l}$

Abb. 4  
Vergleich zweier bekannter Amylase-Bestimmungsmethoden mit dem  
neuen Substrat Amylopektin Azur. Die Ermittlung des Umwandlungs-  
faktors und die Berechnung der Enzymaktivität in U/l sind angegeben

Werte im stehenden und schüttelnden Wasserbad  
verglichen und fanden, daß die Ergebnisse im stehenden  
Wasserbad noch besser reproduzierbar waren. Aus  
20 Bestimmungen der gleichen Amylaselösung fanden  
wir einen Variationskoeffizienten von 2,35%.

### Standardisierung

Da bei der Herstellung von Amylopektin Azur geringe  
Schwankungen im Verhältnis von Remazolbrillant-  
Blau-Molekülen zu Glucose-Molekülen von Charge zu

Charge noch nicht vermieden werden können, muß  
jede neue Charge einmal standardisiert werden. Dies  
kann am einfachsten durch eine Serumstandardlösung  
vorgenommen werden, die Amylase enthält. Dabei ist  
jedoch das Verfallsdatum zu berücksichtigen, da die  
Enzymaktivität selbst bei Lagerung im Kühlschrank  
(4°C) nach 14 Tagen rasch abnimmt. Daher haben  
wir aus lyophilisierter Schweine-Pankreas-Amylase, die  
bei Tiefkühlagerung auch nach 6 Monaten keinen  
Aktivitätsverlust zeigte, in physiologischer NaCl-Lö-  
sung eine Verdünnungsreihe hergestellt und durch  
Vergleich der Extinktionen mit denen der STREET-  
CLOSE (11) — und FRIED-HOEFLMAYR (12) — Methoden  
eine Standardisierung erreicht. Wie aus Abbildung 4  
hervorgeht, ist die Amylopektin Azur-Methode etwa  
doppelt so empfindlich wie der Test nach STREET-CLOSE  
und vierfach so empfindlich wie die Methode nach  
FRIED-HOEFLMAYR. Dabei sind die Grenzen der Be-  
stimmbarkeit sowohl nach unten als auch nach oben  
mit Amylopektin Azur deutlich erweitert. Die vom  
Computer errechneten Gleichungen ergaben für Amylo-  
pektin Azur und die STREET-CLOSE-Methode je eine  
Gerade, die sehr nahe dem Nullpunkt liegt. Aus den  
Gleichungen der beiden Geraden läßt sich, wie in  
Abbildung 4 gezeigt wird, ein Faktor ermitteln, der  
eine rasche Berechnung der Amylaseaktivität in U/l  
erlaubt. Dieser Faktor kann sich aus den oben ge-  
nannten Gründen von Charge zu Charge geringfügig  
verändern. Bei 10 untersuchten Chargen lagen die  
Schwankungen des Faktors bei  $\pm 5\%$ .

### Klinische Ergebnisse

180 Proben von Serum und Urin haben wir auf ihre  
Amylaseaktivität sowohl mit der Amylopektin Azur-  
Methode als auch nach STREET-CLOSE getestet. Aus  
Gründen der Übersichtlichkeit wird in der Abbildung 5

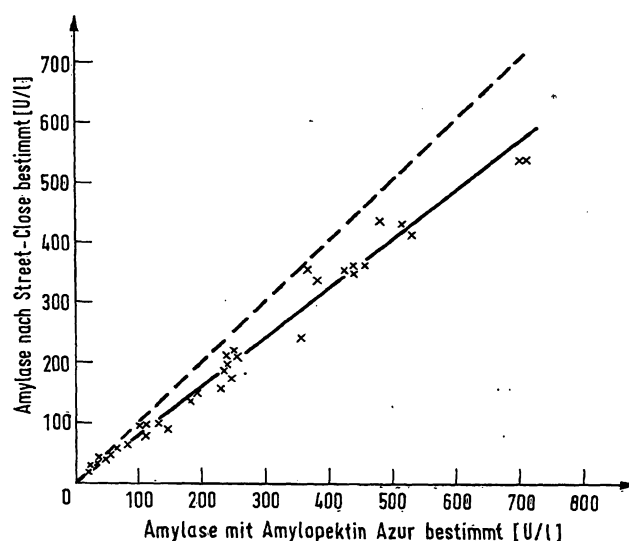
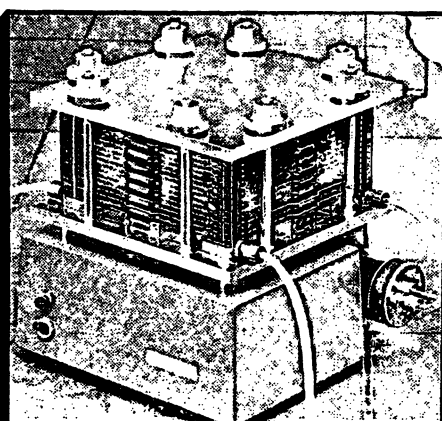


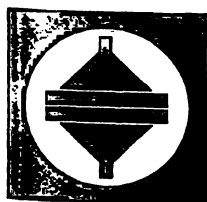
Abb. 5  
180 Amylasebestimmungen aus menschlichem Serum und Urin  
wurden sowohl nach STREET-CLOSE als auch mit Amylopektin Azur  
durchgeführt. Die unterbrochene Linie gibt die Beziehung beider  
Methoden für lyophilisierte Schweine-Pankreas-Amylase an  
Korrelationskoeffizient  $r = 0,9904$   
Regressionsgerade:  $y = 0,7927x + 3,9385$   
Streuung: 21,05

**Kennen Sie  
schon den wirtschaftlichsten  
und schnellsten Weg,  
hochmolekulare Stoffe  
anzureichern?**



Unser neues  
Ultrafiltrationssystem  
arbeitet nach dem  
Überströmungsprinzip.  
Anreicherungen von 20 l  
0,06%igem Rinderserum  
auf 6% in 9 Stunden.

Das wird auch den  
größten Skeptiker  
überzeugen.



**Sartorius-Membranfilter GmbH**

34 Göttingen

Postfach 142

Telefon (0551) 31031

Telex 96830

Sartorius-France S.à.r.l.

B. P. 48

92 Malakoff

Tél. 2530615

Sartorius-Membranfilter Ges.m.b.H. Stromstraße 11 A-1200 Wien Tel. 339395



# Walter de Gruyter Berlin - New York

**Egon Wiberg**

## **Die chemische Affinität**

Eine erste Einführung in die Lehre von der Triebkraft chemischer Reaktionen

2., weitgehend umgearbeitete und stark erweiterte Auflage. Groß-Oktav.  
327 Seiten. Mit 39 Abbildungen im Text.  
1972. Plastik flexibel DM 34,—  
ISBN 3110020920  
(de Gruyter Lehrbuch)

Das vorliegende Buch wendet sich an den thermodynamischen Anfänger und legt vor allem Wert darauf, den Benutzer in den praktischen Gebrauch thermodynamischer Gleichungen und Ableitungen einzuführen. Es gliedert sich in fünf Hauptteile:  
Teil A behandelt den Gesamtumsatz an Reaktionsenergie; Teil B den Umsatz an freier, Teil C den Umsatz an gebundener Reaktionsenergie. Dies gibt Gelegenheit, die drei Hauptsätze der Thermodynamik zu besprechen, die diese drei Umsatzarten regeln, sowie ausführlich auf die drei zugeordneten Begriffe der „Reaktionswärme“, „Reaktionsarbeit“ und „Reaktionsentropie“ einzugehen und speziell die durch die Reaktionswärme und Reaktionsentropie numerisch festgelegte Reaktionsarbeit als das qualitative Maß der chemischen Affinität in den Mittel-

punkt der Betrachtung zu rücken. In Teil D wird dieses Affinitätsmaß zum „Reaktionspotential“ abgewandelt, das in Analogie zur elektromotorischen Kraft ein noch zutreffenderes Maß der chemischen Triebkraft darstellt. Teil E schließlich beschäftigt sich mit Näherungsverfahren zur Erfassung der in Teil C bereits abgeleiteten Temperaturabhängigkeit der chemischen Triebkraft.  
Zahlreiche Rechenbeispiele und anschauliche Diagramme und Abbildungen erleichtern dem Leser das Verständnis für thermodynamische Gedankengänge, Gleichungen und Begriffe. Ein umfangreiches thermodynamisches Zahlenmaterial im Anhang erhöht den Wert und Nutzen des Buches.

For USA and Canada:

Please send all orders to Walter de Gruyter Inc, 162 Fifth Avenue, New York, N. Y. 10010

## BIOCHIMIE

Edité par la Société de Chimie Biologique

tel est le titre

sous lequel paraîtra à partir de 1971

le „BULLETIN DE LA SOCIÉTÉ DE CHIMIE BIOLOGIQUE“

### SECRÉTARIAT

de la Société de Chimie Biologique

J. P. EBEL, Secrétaire Général (Relations Extérieures)  
R. PERLES, Secrétaire Général

### REDACTION

F. GROS, Secrétaire scientifique  
F. PÉRCHERON, Secrétaire à la Publication  
J. NUNEZ, Secrétaire à l'Information  
Y. RAOUL, Secrétaire à l'Édition

SECRETARIAT et REDACTION: 4 Avenue de l'Observatoire, PARIS 6°

12 FASCICULES

ABONNEMENTS: FRANCE et ZONE FRANC: 150 ffrcs · BELGIQUE: 1.687,— frcs · AUTRES PAYS: 186,— ffrcs

MASSON et Cie, Editeurs · 120 Boulevard St Germain · PARIS 6ème

nur ein Teil der Ergebnisse dargestellt. Die vom Computer errechneten Daten zeigen eine sehr gute Korrelation der beiden Methoden. Es fällt jedoch auf, daß die Bestimmung mit Amylopektin Azur um 25% höhere Werte gibt als die Methode nach STREET-CLOSE. Dadurch wird die obere Grenze des klinischen Normbereiches bei Verwendung von Amylopektin-Azur auf 250 U/l Amylase im Serum und 1500 U/l Amylase im Urin erweitert. Die Bestimmung einer Probe kann in 30 Min. vollzogen sein, womit ein wesentlicher Fortschritt für den ärztlichen Notfall und die überlasteten klinischen Laboratorien gegeben ist.

### Diskussion

Während bei den amyloklastischen Methoden der Amylasebestimmung die Bildung des Jod-Stärke-Farbkomplexes beeinflusst wird vom pH-Wert (2), Temperatur (3), Jodidkonzentration (4, 5) und Eiweißkonzentration (6), wird der Wert der saccharogenen Methoden eingeschränkt durch unterschiedliche Bestimmungen der reduzierenden Gruppen (7) und den großen Zeitaufwand.

Bei dem neuen Prinzip der Amylasebestimmung, die man als chromogene Methode bezeichnet hat, enthält das Substrat Farbstoffmoleküle, die die abgespaltenen Oligosaccharide markieren. Die Vorteile der hier beschriebenen Methode, die Enzymaktivitäten bis 600 U/l Amylase erfaßt, sind gute Reproduzierbarkeit (Variationskoeffizient 2,35%), rasche Durchführbarkeit und keine Beeinflussung durch Eiweißgehalt, Bilirubin und pH-Schwankungen.

In früheren Untersuchungen (8, 9) war wegen des störenden Oberflächenfilms nach Zentrifugieren noch Filtrieren vorgeschlagen worden. Da Amylase aus Stärke unterschiedlich große Oligosaccharide abspaltet, werden diese beim Filtrieren je nach Porengröße des

Filters retiniert. Diese Problematik wird durch die Verwendung von Aceton-Essigsäure umgangen, wodurch sowohl die Empfindlichkeit als auch die Durchführbarkeit der Methode verbessert wurden.

Während geringe Erhöhungen des freien Hämoglobins, die makroskopisch keine Verfärbung des Serums bedingen, vernachlässigt werden können, muß bei makroskopisch hämolytischen Proben jeweils der spezielle Leerwert zur Korrektur mitlaufen. Die Kenntnis dieser Fehlerquelle ist wichtig, da im klinischen Labor fast alle Serumamylasen nur gegen einen Serumleerwert bestimmt werden.

Der Nachteil dieser Methode für die Klinik besteht in der Standardisierung. Da bei der Herstellung des Substrates kein absolut konstantes Verhältnis von Farbstoff- zu Glucose-Molekülen reproduzierbar ist, muß jede neue Charge, d. h. nach 500 Tests, standardisiert werden. Am einfachsten geschieht dies mit einem Standardserum, das Amylase enthält. HALL und Mitarbeiter (9) haben eine 0,1proz.  $\text{CuSO}_4$ -Lösung als Referenzlösung vorgeschlagen, was jedoch nach dem oben gesagten wenig sinnvoll erscheint. Eine Eichung ist ferner möglich mit einer reinen Amylaselösung, deren Aktivität mit einer anderen Methode bestimmt wird. Die Tatsache, daß dann reine Amylaselösungen mit beiden Methoden die gleichen Ergebnisse liefern, bedeutet jedoch keineswegs, daß auch Amylasen in Serum und Urin mit beiden Methoden ein identisches Resultat ergeben. Die Anwesenheit zahlreicher anderer Substanzen in Serum und Urin beeinflussen die Aktivität des Enzyms und seine Bindung an das Substrat. So zeigte die gleiche Amylaselösung mit dem gleichen Substrat Amylopektin Azur bei Verwendung von Tris-Puffer statt Phosphat-Puffer einen Aktivitätsunterschied von 40%. Welche Faktoren im Serum im einzelnen die Aktivität der Amylase hemmen oder fördern, ist nicht bekannt.

### Literatur

1. SEARCY, R. L., P. WILDING und J. E. BERK, Clin. Chim. Acta, Amsterdam 15, 189 (1967). — 2. REIF, A. E. und D. C. NABSETH, Clin. Chem., New York 8, 113 (1962). — 3. RICHTERICH, R. und J. P. COLOMBO, Ärztl. Lab. 8, 33 (1962). — 4. SZEJTLI, J., M. RICHTER und S. AUGUSTAT, Biopolymers 5, 5 (1967). — 5. SZEJTLI, J., S. AUGUSTAT und M. RICHTER, Biopolymers 5, 17 (1967). — 6. SEARCY, R. L., I. UJIHARA, S. HAYASHY und J. E. BERK, Clin. Chim. Acta, Amsterdam 9, 505 (1964). — 7. HENRY, R. J., Clinical Chemistry, Principles and Technics, 5th ed. p. 475, Harper & Row,

Inc. New York (1968). — 8. RINDERKNECHT, H., P. WILDING und B. J. HAVERBACK, Experientia, Basel 23, 805 (1967). — 9. HALL, F. F., T. W. CULP, T. HAYAKAWA, C. R. RATLIFF und N. C. HIGHTOWER, Amer. J. Clin. Path. 53, 627 (1970). — 10. LORENTZ, K., A. ZANDER und J. ADLUNG, diese Z. 7, 241 (1969). — 11. STREET, H. V. und J. R. CLOSE, Clin. Chim. Acta, Amsterdam 3, 476 (1958). — 12. FRIED, R. und J. HOEFELMAYR, Ärztl. Lab. 11, 42 (1965).

Dr. H. Weis  
I. Med. Klinik  
6500 Mainz  
Langenbeckstr. 1